

## 明細書

## プロカスパーーゼ1活性化阻害剤

## 技術分野

[0001] 本発明は、NOD2とプロカスパーーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の多量体化阻害方法、プロカスパーーゼ1の活性化阻害方法およびカスパーーゼ1 (caspase-1) の生成阻害方法に関する。また、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。さらに、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を阻害する化合物の同定方法に関する。また、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の多量体化阻害剤、プロカスパーーゼ1の活性化阻害剤およびカスパーーゼ1の生成阻害剤、あるいは炎症性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。さらに、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいづれか1つと、プロカスパーーゼ1、プロカスパーーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいづれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

## 背景技術

[0002] カスパーーゼ1は、インターロイキン1  $\beta$  転換酵素 (interleukin-1  $\beta$  -converting enzyme; ICE) とも呼ばれ、炎症性サイトカインであるインターロイキン1 (以下、IL-1  $\beta$  と略称する) やインターロイキン18 (以下、IL-18と略称する) をその前駆体から成熟型へと変換するシステインプロテアーゼである (非特許文献1-4)。カスパーーゼ1遺伝子は炎症性刺激、例えばリポポリサッカライド (以下、LPSと略称する) で誘導され、カスパーーゼ1活性も同様の刺激で増加する (非特許文献4-6)。また、種々の炎症性疾患、例えば、敗血症、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease)、リウマチ等において、カスパーーゼ1活性の促進が報告されている。

[0003] カスパーーゼ1は、カスパーーゼ1前駆体として発現するプロカスパーーゼ1が多量体化を起こし、それに伴う自己切断により生成されると考えられている。この過程において、

プロカスパーゼ1の多量体化は、RIP2またはNOD1がプロカスパーゼ1と結合することで誘導されることが報告されている(非特許文献7および8)。

[0004] 以下に本明細書において引用した文献を列記する。

特許文献1:国際公開第WO01/67299号パンフレット。

非特許文献1:「ネイチャー(Nature)」、1992年、第356巻、p. 768-774。

非特許文献2:「サイエンス(Science)」、1992年、第256巻、p. 97-100。

非特許文献3:「ネイチャー」、1997年、第386巻、p. 619-623。

非特許文献4:「サイエンス」、1997年、第275巻、p. 206-209。

非特許文献5:「ネイチャー」、1994年、第370巻、p. 270-275。

非特許文献6:「ブラッド(Blood)」、1998年、第91巻、p. 577-584。

非特許文献7:「カレント バイオロジー(Recent Biology)」、1998年、第8巻、p. 885-888。

非特許文献8:「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ(Biochemical and Biophysical Research Communications)」、2002年、第299巻、p. 652-658。

非特許文献9:「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 41701-41705。

非特許文献10:「ガット(Gut)」、2003年、第52巻、p. 840-846。

非特許文献11:「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー」、2001年、第276巻、p. 4812-4818。

非特許文献12:ウルマー(K. M. Ulmer)、「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

非特許文献13:「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

非特許文献14:「ペプチド シンテシス(Peptide Synthesis)」、インターバイエンス(Interscience)、ニューヨーク(New York)、1996年。

非特許文献15:「セル(Cell)」、1995年、第80巻、p. 401-411。

非特許文献16:「サイエンス」、1995年、第267巻、p. 2000-2003。

非特許文献17:「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイ

エンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2001年、第98巻、p13249–13254。

非特許文献18:「ネイチャー」、2003年、第423巻、p. 356–361。

非特許文献19:「バイオケミカル ファーマコロジー(Biochemical Pharmacology)」、2002年、第64巻、p. 1–8。

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、プロカスパーゼ1と結合してこれの多量体化を促進し、これを活性化する新たな蛋白質を見出し、該蛋白質とプロカスパーゼ1の結合を阻害することにより、プロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害、ひいては炎症性疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、プロカスパーゼ1がNOD2と相互作用することをインシリコ(in silico)で予測し、そしてNOD2とプロカスパーゼ1が結合することにより、プロカスパーゼ1の多量体化が促進され、その結果プロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化およびカスパーゼ1の生成が引き起こされることを実験的に証明して本発明を完成した。

[0007] すなわち本発明は、以下の群より選ばれる阻害方法に関する；

- (i) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害方法、
- (ii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害方法、
- および
- (iii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするカスパーゼ1(caspase-1)の生成阻害方法。

[0008] また本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害すること

を特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

[0009] さらに本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ用いることを特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

[0010] さらにまた本発明は、炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである前記防止方法および／または治療方法に関する。

[0011] また本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物の同定方法であって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件下、NOD2および／またはプロカスパーゼ1を化合物と接触させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するか否かを決定する方法に関する。

[0012] さらに本発明は、以下の群より選ばれる阻害剤に関する；

- (i) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、
- (ii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、

および

- (iii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするカスパーゼ1(caspase-1)の生成阻害剤。

[0013] さらにまた本発明は、以下の群より選ばれる阻害剤に関する；

- (i) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、
- (ii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、

および

- (iii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくと

も1つ含有するカスパーゼ1(caspase-1)の生成阻害剤。

- [0014] また本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。
- [0015] さらに本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。
- [0016] さらにまた本発明は、前記阻害剤を含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。
- [0017] また本発明は、炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである前記いずれかの防止剤および／または治療剤に関する。
- [0018] さらに本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合阻害によるプロカスパーゼ1の多量体化阻害を特徴とする、炎症性疾患の防止剤および／または治療剤に関する。
- [0019] また本発明は、炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである前記防止剤および／または治療剤に関する。
- [0020] さらに本発明は、前記同定方法に用いることを特徴とする試薬キットであって、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、プロカスパーゼ1(procaspase-1)、プロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

## 発明の効果

- [0021] 本発明ではNOD2がプロカスパーゼ1と結合することを見出した。すなわち、NOD2とプロカスパーゼ1が結合することにより、プロカスパーゼ1の多量体化が促進され、その結果プロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化およびカスパーゼ1の生成が引き起こされることを初めて明らかにした。カスパーゼ1は炎症性反応に関与する因子であり、炎症性疾患においてその活性の促進が報告されている。これらから、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害することを特徴とする本発明は、炎症性疾患の

防止および／または治療のために非常に有用である。

### 図面の簡単な説明

[0022] [図1-A]FLAG—procaspase—1(C285A)発現用プラスミドのみ、NOD2—myc—His発現用プラスミドのみ、または両方を組み合わせてトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液における各蛋白質の発現量を示す図である。蛋白質の検出はウェスタンブロッティング(WB)により行った。(実施例2)

[図1-B]左図は、NOD2—myc—HisとFLAG—procaspase—1(C285A)を共発現させた細胞から作製した細胞溶解液について抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降(IP)した結果、NOD2—myc—Hisのバンドが検出されたことを示す図である。右図は、上記細胞溶解液について抗myc抗体で免疫沈降した結果、NOD2—myc—HisとFLAG—procaspase—1(C285A)を共発現させた細胞溶解液でのみ、FLAG—procaspase—1(C285A)のバンドが検出されたことを示す図である。蛋白質の検出はウェスタンブロッティング(WB)により行った。(実施例2)

[図2-A]FLAG—procaspase—1(C285A)発現用プラスミドおよびMyc—procaspase—1(C285A)発現用プラスミドと図示した濃度のNOD2—myc発現用プラスミドとをトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液を抗FLAG抗体で処理して得た画分において、抗myc抗体で検出されるバンドの量がNOD2—myc発現用プラスミド量依存的に増加したことを説明する図である。(実施例3)

[図2-B]FLAG—procaspase—1(C285A)発現用プラスミドおよびMyc—procaspase—1(C285A)発現用プラスミドと図示した濃度のNOD2—myc発現用プラスミドとをトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液における各蛋白質の発現量を示す図である。(実施例3)

[図3]FLAG—procaspase—1発現プラスミドとNOD2—myc発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2—mycの発現量依存的に細胞内IL—1 $\beta$ 量の増加が認められたことを説明する図である。(実施例4)

[図4]FLAG—procaspase—1発現プラスミド(0. 5  $\mu$ g)とNOD2発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2発現プラスミド量依存的に、細胞外へのIL—1 $\beta$ 分泌量が増加したことを説明する図である。図中、ベクターとは、各細胞に導入するDN

A量を一定にするために加えた空ベクターを意味する。(実施例4)

### 発明を実施するための最良の形態

[0023] 以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「ポリペプチド」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

[0024] 本発明においては、NOD2がプロカスパーゼ1と相互作用することを、国際公開WO1/67299号パンフレット記載の方法に従ってインシリコで予測した。そして実験的に、NOD2がプロカスパーゼ1と結合することを明らかにした。さらに、NOD2とプロカスパーゼ1が結合することにより、プロカスパーゼ1の多量体化が促進され、その結果プロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化およびカスパーゼ1の生成が引き起こされ、細胞内でIL-1 $\beta$ 前駆体(proIL-1 $\beta$ )のカスパーゼ依存的な切断が誘導されて成熟型IL-1 $\beta$ の分泌が促進されることを初めて明らかにした。

[0025] NOD2は、CARD15とも呼ばれ、単球(非特許文献9)、好中球(非特許文献9)、白血球(非特許文献9)、顆粒球(非特許文献9)、樹状細胞(非特許文献9)、腸上皮細胞(非特許文献9および10)、およびマクロファージ(非特許文献10)で発現していること、急性前骨髄球性白血病細胞株HL-60や正常大腸細胞株FHCではLPSや腫瘍壞死因子 $\alpha$ (以下、TNF- $\alpha$ と略称する)等の炎症刺激でNOD2遺伝子が増加することが報告されている(非特許文献9)。NOD2の機能としては、NOD2遺伝子をHL-60細胞に一過性発現させることによりNF- $\kappa$ Bが活性化されることが報告されている(非特許文献11)。しかしながら、NOD2がプロカスパーゼ1と結合して機能するという報告はない。

[0026] これらから、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害することにより、プロカスパーゼ1の多量体化、プロカスパーゼ1の活性化およびカスパーゼ1の生成を阻害でき、その結果、カスパーゼ1の増加により発症・進展する炎症性疾患の防止および/または

治療が可能になる。

[0027] これら知見に基づいて、本発明においては、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害することを特徴とする、プロカスパーゼ1の多量体化阻害方法、プロカスパーゼ1の活性化阻害方法およびカスパーゼ1の生成阻害方法、並びにカスパーゼ1の増加に基づく疾患、具体的には炎症性疾患の防止方法および／または治療方法を提供する。

[0028] NOD2遺伝子および該遺伝子がコードするポリペプチドは、それぞれ配列表の配列番号1および配列番号2に記載の各配列からなる。プロカスパーゼ1遺伝子および該遺伝子がコードするポリペプチドは、それぞれ配列表の配列番号3および配列番号4に記載の各配列からなる。NOD2、プロカスパーゼ1およびこれらの遺伝子は上記各配列からなるものに限らず、一般に知られているNOD2およびプロカスパーゼ1の機能を有する限りにおいて、上記各配列において1乃至数個の変異を有するポリペプチドおよびポリヌクレオチドであることができる。また、これらの機能を促進するあるいは欠失させるといった所望の目的のために、上記各配列に1乃至数個の変異を導入した変異体であることもできる。

[0029] 「NOD2とプロカスパーゼ1の結合」とは、NOD2とプロカスパーゼ1が複合体を形成するように、水素結合、疎水結合および静電的相互作用等の非共有結合により、NOD2とプロカスパーゼ1が相互作用することを意味する。ここでの結合とは、NOD2とプロカスパーゼ1がそれら分子の一部分において結合すれば足りる。例えば、NOD2またはプロカスパーゼ1を構成するアミノ酸の中に、NOD2とプロカスパーゼ1の結合に関与しないアミノ酸が含まれていてもよい。

[0030] NOD2とプロカスパーゼ1の結合は、免疫沈降法による共沈物の確認、ツーハイブリッド法、ウェスタンプロット法および蛍光共鳴エネルギー転移法等の自体公知の方法またはこれら的方法を組合せることにより検出され得る。

[0031] 例えば、実施例2に示すように、C末にmyc-His-tagが付加されたNOD2とN末にFLAG-tagが付加されたプロカスパーゼ1との結合を、両ポリペプチドの共存下において、抗myc抗体または抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降した共沈物を抗FLAG M2抗体または抗myc抗体を用いてウェスタンプロッティングすることにより検

出され得る。

[0032] 「プロカスパーゼ1の多量体化」とは、プロカスパーゼ1同士が結合し、該結合により複合体を形成することを意味する。多量体化は、NOD2とプロカスパーゼ1とが結合することにより促進される。また、プロカスパーゼ1が有するカスパーゼリクルートメントドメイン(Caspase recruitment domain; CARD)が、多量体化に重要な役割を果たしていることが知られている。該複合体を構成するプロカスパーゼ1の分子数は特に制限されず、プロカスパーゼ1が自己を切断し、その結果、カスパーゼ1が生成される程度に、プロカスパーゼ1同士が結合し、複合体を形成すればよい。

[0033] 「プロカスパーゼ1の活性化」とは、プロカスパーゼ1の多量体化に伴い、プロカスパーゼ1が自己切断され、カスパーゼ1が生成されることを意味する。NOD2とプロカスパーゼ1とが結合することによりプロカスパーゼ1の多量体化が促進され、それに伴う自己切断が起こり、その結果、カスパーゼ1が生成される。

[0034] 「カスパーゼ1の生成」とは、プロカスパーゼ1が活性化された結果、カスパーゼ1が生成されることを意味する。

[0035] プロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害は、例えば、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を用いることにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する化合物(後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる)を阻害剤と称する。

[0036] NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物として、好ましくは当該結合を特異的に阻害する化合物、より好ましくは当該結合を特異的に阻害する低分子量化合物が挙げられる。NOD2とプロカスパーゼ1の結合を特異的に阻害するとは、当該結合を強く阻害するが、他の蛋白質間結合は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

[0037] NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物として、例えば、NOD2とプロカスパーゼ1が結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示できる。かかるポリペプチドは、蛋白質間の結合を競合的に阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化およびプロカスパーゼ1の自己切断を阻害することができる。かかるポリペ

ペプチドは、NOD2またはプロカスパーゼ1のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものを選択することにより得ることができる。このように特定されたポリペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー(Ulmer)の技術(非特許文献12)を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質(物性、機能または免疫学的活性等)を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互の置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

[0038] 上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、成書(非特許文献13および14)に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等を挙げることができる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換えDNA(発現ベクター)を作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造可能である。

[0039] NOD2とプロカスパーゼ1の結合の阻害は、NOD2またはプロカスパーゼ1を認識する抗体であって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する抗体を用いることによつても実施可能である。かかる抗体は、NOD2またはプロカスパーゼ1自体、またはこれらの断片ポリペプチド、好ましくはNOD2とプロカスパーゼ1が結合する部位の

アミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

[0040] NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して当該化合物の同定方法を構築し、これを使用して取得可能である。例えば、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件を選択し、当該条件下で、調べようとする化合物(被検化合物)とNOD2および/またはプロカスパーゼ1とを接触させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび/またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を同定できる。例えばNOD2とプロカスパーゼ1の結合により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物をNOD2および/またはプロカスパーゼ1と接触させたときに消失する、あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物はNOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものであると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物をNOD2および/またはプロカスパーゼ1と予め接触させ、その後にNOD2とプロカスパーゼ1を結合させることも可能であり、または被検化合物をこれらの結合の過程に共存させることも可能である。NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、NOD2とプロカスパーゼ1とを共発現させた細胞を用いることもできる。細胞における共発現は、NOD2をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとプロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより達成できる。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼや放射性同位体等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。NOD2とプロカスパーゼ1の結

合は、簡便には、これら蛋白質の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により判定可能である。蛋白質の検出あるいは蛋白質量の定量は、自己公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法等を用いて実施できる。

[0041] 具体的には、例えばNOD2またはプロカスパーゼ1の一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ(*in vitro*)における結合実験系に、被検化合物を加えて評価することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を得ることができる。

[0042] あるいは、実施例2に示したように、NOD2遺伝子およびプロカスパーゼ1遺伝子を共発現させた細胞を用いて細胞内における結合反応を検出する試験系に、被検化合物を作用させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を免疫沈降法やウェスタンブロッティング等の公知方法で検出することによって、インビボ(*in vivo*)においてNOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を得ることができる。

[0043] また、公知のツーハイブリッド(two-hybrid)法を用いることも可能である。例えば、NOD2とDNA結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、プロカスパーゼ1と転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したlacZ等レポーター遺伝子を含有するプラスミドを酵母、真核細胞等に導入し、被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量を被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較することにより達成できる。被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して減少した場合には、該被検化合物にはNOD2とプロカスパーゼ1との結合を阻害する作用があると判定できる。

[0044] ビアコアシステム(BIACORE system)等の表面プラズモン共鳴センサー、シンチレーションプロキシミティアッセイ法(Scintillation proximity assay、SPA)、あるいは蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence resonance energy transfer、FRET)を応用した方法を用いて、NOD2とプロカスパーゼ1との結合を阻害する化合物を同定することも可能である。

[0045] また、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を可能にする条件を選択し、該条件下でNOD2および／またはプロカスパーゼ1と被検化合物を接触させ、次いで、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する化合物を同定可能である。例えば、実施例3に示したように、NOD2遺伝子またはプロカスパーゼ1遺伝子を共発現させた細胞を用いて細胞内におけるカスパーゼ1の多量体化を測定する実験系を用いて、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する化合物を同定可能である。

[0046] また、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を可能にする条件を選択し、該条件下でNOD2および／またはプロカスパーゼ1と被検化合物を接触させ、次いで、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を阻害する化合物を同定可能である。例えば、実施例4に示したように、NOD2遺伝子およびプロカスパーゼ1遺伝子が共発現するIL-1 $\beta$  安定発現細胞外に分泌されるIL-1 $\beta$  量を低減させる、または消滅させる化合物を選択することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を阻害することにより、プロカスパーゼ1の自己切断によるカスパーゼ1の生成が阻害されるため、該化合物はカスパーゼ1の生成を阻害する化合物としても用い得る。

[0047] NOD2およびプロカスパーゼ1は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、NOD2とプロカスパーゼ1の結合、およびこれら蛋白質の機能、さらにプロカスパーゼ1からその活性化により生成されるカスパーゼ1の性質等に影響がなければ、N末側やC末側に別の蛋白質やポリペプチド、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド

類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加したものであってもよい。

[0048] NOD2とプロカスパーゼ1の結合またはNOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する化合物の同定においては、該結合によるプロカスパーゼ1の多量体化に伴うプロカスパーゼ1の自己切断により、該結合または該多量体化の検出が困難になる場合がある。かかる場合は、結合または多量体化を容易に検出するために、NOD2と結合して多量体化するが自己切断されないプロカスパーゼ1変異体、例えばそのアミノ酸配列285番目のシステインをアラニンに置換した変異体を作製して用いることもできる。

[0049] 被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはNOD2またはプロカスパーゼ1の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、NOD2とプロカスパーゼ1の結合部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

[0050] 上記同定方法で得られた化合物は、プロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、プロカスパーゼ1の活性化阻害剤およびカスパーゼ1の生成阻害剤として利用可能である。当該化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

[0051] 上記化合物および上記阻害剤はさらに、カスパーゼ1の作用やその増加に基づく疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に利用可能である。かかる疾患としては、例えば敗血症、炎症性腸疾患、クローン病およびリウマチ等を挙げることができる。

[0052] 敗血症は、細菌や毒素(エンドトキシンやエキソトキシン等)等の刺激によって遊離された炎症性サイトカインによって惹起される生体の過剰な反応、すなわち感染に起因した全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome)である。カスパーゼ1遺伝子欠損マウスでは、エンドトキシンショックに対する抵抗性が増すことが報告されている(非特許文献15)。また、カスパーゼ1遺伝子欠損マウス

から調製されたマクロファージや単球で、LPSで誘導されるIL-1 $\beta$ およびIL-18の産生がほぼ完全に抑制されることが報告されている(非特許文献4、15および16)。これらから、カスパーゼ1の活性を阻害することにより、マクロファージや単球から分泌されるIL-1 $\beta$ およびIL-18の産生増加を介して起こるエンドトキシンショックを抑制し得ると考えられる。一方、NOD2遺伝子も単球やマクロファージで発現が確認されている(非特許文献9および10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害により敗血症の防止および/または治療が可能になると考える。

[0053] 炎症性腸疾患は、多くは慢性に経過し、難治性の種々の病因(クローン病等)によって生じる大腸や小腸の炎症性疾患を指す。正常マウスにデキストラン硫酸(以下、DSSと略称する)を慢性投与した場合には大腸炎を発症するが、カスパーゼ1遺伝子欠損マウスにDSSを慢性投与した場合には大腸炎を発症しないこと、DSS投与したカスパーゼ1遺伝子欠損マウスから調製した大腸組織培養のIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌量は、DSS投与した正常マウスに比して有意に減少していることが報告されている(非特許文献17)。これらの結果は、大腸炎の発症・進展にカスパーゼ1活性の増加とそれに伴うIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌の増加が重要である可能性を示すものである。一方、NOD2遺伝子も腸上皮細胞やマクロファージで発現が確認されている(非特許文献10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害により炎症性腸疾患の防止および/または治療が可能になると考える。

[0054] リウマチは、関節の滑膜に存在するマクロファージから分泌されるサイトカインによって進行し、IL-1 $\beta$ やIL-18もリウマチの進行に寄与していることが報告されている(非特許文献18)。また、コラーゲンで誘導される関節炎モデルマウスにカスパーゼ1阻害剤を投与すると炎症が抑制されることが報告されている(非特許文献19)。これらの事実は、滑膜のマクロファージにおけるカスパーゼ1活性の増加とそれに伴うIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌の増加がリウマチの進行に寄与している可能性を示すもの

である。実際、リウマチ治療薬としてカスパーゼ1阻害剤(Pralnacasan、Vertex社)が臨床試験第2相の進行中である。NOD2が滑膜に存在するマクロファージに発現しているという報告はない。しかしながら、大腸に存在するマクロファージに発現しているという報告がある(非特許文献10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害によりリウマチの防止および/または治療が可能になると考える。

[0055] 本発明に係る疾患の防止剤および/または治療剤として、NOD2とプロカスパーゼ1との結合阻害によるプロカスパーゼ1の多量体化阻害、NOD2とプロカスパーゼ1との結合阻害によるプロカスパーゼ1の活性化阻害、およびNOD2とプロカスパーゼ1との結合阻害によるカスパーゼ1生成阻害のうち少なくともいづれか1つの阻害を特徴とする、防止剤および/または治療剤を例示できる。好ましくは、NOD2とプロカスパーゼ1との結合阻害によるプロカスパーゼ1の多量体化阻害を特徴とする、防止剤および/または治療剤を挙げられる。かかる疾患として、炎症性疾患、好ましくは、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病、リウマチを例示できる。このような防止剤および/または治療剤として、例えば上記プロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、上記プロカスパーゼ1の活性化阻害剤、および上記カスパーゼ1の生成阻害剤のうち少なくともいづれか1つを有効成分としてその有効量含む、炎症性疾患の防止剤および/または治療剤を例示することができる。

[0056] 本発明に係る疾患の防止剤および/または治療剤は、上記化合物、上記プロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、上記プロカスパーゼ1の活性化阻害剤および上記カスパーゼ1の生成阻害剤のうち少なくともいづれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することができる。

[0057] 本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲するのが適当である。

[0058] 医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、

結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

[0059] 例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

[0060] 所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

[0061] 安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターーチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が含まれる。

[0062] 緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、グルタミン

酸および／またはそれらに対応する塩(例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩)等を例示できる。

- [0063] 等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。
- [0064] キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。
- [0065] 本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生埋的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。
- [0066] 医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質(体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等)、および担当医師の判断等応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01  $\mu$ g乃至100mg程度、好ましくは約0.1  $\mu$ g～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は1日1～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。
- [0067] 本発明の医薬組成物を投与するときには、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは目的の疾患の防止および／または治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。
- [0068] 投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。
- [0069] 投与形態としては、各種の形態が目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキ

ストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤(点滴剤、注射剤)、経鼻剤、吸入剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

[0070] さらに本発明は、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、プロカスパーゼ1、プロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなるキットを提供する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

[0071] ポリヌクレオチドは、例えばヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体は、当該ポリヌクレオチドを適当な発現DNAベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的手法で導入することにより、また得られたベクターを周知の方法で適当な細胞にトランスフェクションすることにより得られる。

[0072] 上記キットは、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それに応じた製剤化手段を導入すればよい。

[0073] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

## 実施例 1

[0074] (プロカスパーゼ1と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

プロカスパーゼ1と相互作用する機能を有する蛋白質を、特許文献1に記載の予測方法に従って予測した。すなわち、プロカスパーゼ1のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同的なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とプロ

カスパーゼ1との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをプロカスパーゼ1と相互作用すると予測した。

解析の結果、プロカスパーゼ1と相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、NOD2を見出した。

## 実施例 2

### [0075] (NOD2とプロカスパーゼ1の結合解析)

NOD2とプロカスパーゼ1が結合するか否かを、インビボ バインディングアッセイにより検討した。

### [0076] <材料およびその調製>

本実施例においては、プロカスパーゼ1として、プロカスパーゼ1のアミノ酸配列285番目のシステインをアラニンに変換した変異体(C285A)を用いた。プロカスパーゼ1(C285A)は、この1アミノ酸置換により、自己切断が起きない。プロカスパーゼ1(C285A)のオープンリーディングフレーム(以下、ORFと略称する)をpCMV-Tag2(STRATAGENE社)に挿入し、N末にFLAG-tagが付加されたプロカスパーゼ1(C285A)[FLAG-procaspase-1(C285A)]発現用プラスミドを得た。また、NOD2のORFをpcDNA3.1/myc-His(INVITROGEN社)に挿入し、C末にmyc-His-tagが付加されたNOD2(NOD2-myc-His)発現用プラスミドを得た。

### [0077] <方法>

HEK293T細胞に、FLAG-procaspase-1(C285A)発現用プラスミドのみ、NOD2-myc-His発現用プラスミドのみ、または両方を組み合わせて、FuGene6(Roche社)を用いてトランスフェクションした。各発現用プラスミドは、それぞれ2.5  $\mu$ gずつ用いた。また、DNAの総量は5  $\mu$ gとなるようにpCMV-Tag2またはpcDNA3.1(-)/myc-Hisにて調整した。48時間培養後、0.5mlのリシスバッファー1[lysis buffer 1:50mM Tris-HCl(pH7.6)/150mM NaCl/0.1% ノニデットP-40(NP-40)]にて細胞溶解液を作製した。各細胞溶解液にマウスIgG結合アガロース(mouse IgG-conjugated agarose、Sigma社)またはウサギIgG結合アガロース(Sigma社)を添加し、4°Cで1時間転倒混和した後、上清を回収した。各上清に抗FLAG M2抗体結合アガロース(Santa Cruz社)または抗myc抗体結合アガロ

ース(Santa Cruz社)を添加し、4°Cで一晩転倒混和した後、上清を除去して結合画分を回収した。結合画分をSDS-PAGEで展開後、抗myc抗体(Santa Cruz社)および抗FLAG M2抗体を用いたウエスタンブロッティングにて各蛋白質を検出した。また、各細胞溶解液についてもウエスタンブロッティングにて各蛋白質を検出した。

[0078] <結果>

図1-Aに示すように、それぞれの細胞溶解液に目的とする蛋白質が発現していることが確認できた。また、図1-Bの左図に示すように、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1(C285A)を共発現させた細胞から作製した細胞溶解液について抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降した結果、NOD2-myc-Hisのバンドが検出された。そのバンド強度は、NOD2-myc-Hisを単発現させて作製した細胞溶解液を免疫沈降した時に検出されたバンド強度に比して強かったことから、NOD2がプロカスパーゼ1と共に沈すると考えられた。また同様に、図1-Bの右図に示すように抗myc抗体で免疫沈降した結果、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1(C285A)を共発現させた細胞溶解液でのみ、FLAG-procaspase-1(C285A)のバンドが検出されたことから、プロカスパーゼ1がNOD2と共に沈すると考えられた。以上の結果から、NOD2はプロカスパーゼ1と結合すると結論づけた。

### 実施例 3

[0079] (NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化の促進の検討)

プロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化は、プロカスパーゼ1の多量体化とそれに伴う自己切断により引き起こされると考えられている。そこで、NOD2がプロカスパーゼ1の多量体化にどのような効果を示すか検討を行った

[0080] <材料およびその調製>

各発現用プラスミド

プロカスパーゼ1(C285A)ORFをpCMV-Tag3(STRATAGENE社)に挿入し、N末にmyc-tagが付加されたプロカスパーゼ1(C285A)[Myc-procaspase-1(C285A)]発現用プラスミドを得た。また、NOD2 ORFをpCMV-Tag5(STRATAGENE社)に挿入し、C末にmyc-tagが付加されたNOD2(NOD2-myc)発現

用プラスミドを得た。さらに、実施例2と同様の方法で調製したFLAG—procaspase—1(C285A)を用いた。

[0081] <方法>

HEK293T細胞に、FLAG—procaspase—1(C285A)発現用プラスミド0. 5  $\mu$  gおよびMyc—procaspase—1(C285A)発現用プラスミド0. 5  $\mu$  gとNOD2—myc発現用プラスミド0~1. 0  $\mu$  gとをFuGene6 (Roche社)を用いてトランスフェクションした。DNAの総量は2  $\mu$  gとなるようにpCMV—Tag5にて調整した。24時間培養後、0. 25ml/wellのリシスバッファー2[20mM Tris—HCl(pH7. 5)／150mM NaCl／2mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)／0. 5% NP-40]にて細胞溶解液を作製した。各細胞溶解液0. 2mlに抗FLAG M2抗体結合アガロース15  $\mu$  lを添加し、4°Cで一晩転倒混和した後、上清を除去してアガロースを回収した。リシスバッファー2を0. 5ml用いてアガロースを2回洗浄後、2× SDSサンプルバッファーを15  $\mu$  l加え、100°Cで5分間熱処理した。SDS-PAGEで展開し、抗myc抗体を用いてウエスタンプロッティングを行い、FLAG—procaspase—1(C285A)と結合して共沈するMyc—procaspase—1(C285A)の量を測定することでプロカスパーーゼ1の多量体化の度合いを評価した。また、各細胞溶解液についてウエスタンプロッティングにて各蛋白質の発現量をチェックした。

[0082] <結果>

図2-Aに示すように、細胞溶解液から抗FLAG M2抗体により回収された試料において、NOD2—myc発現用プラスミド量依存的に抗myc抗体で検出されるバンドの量が増加した。このことは、FLAG—procaspase—1(C285A)と結合するMyc—procaspase—1(C285A)量が、NOD2—myc発現用プラスミド量依存的に増加したことを意味する。また図2-Bに示すように、各発現用プラスミドをトランスフェクションした細胞のいずれにおいても、Myc—procaspase—1(C285A)およびFLAG—procaspase—1(C285A)がほぼ同量発現していることが確認できた。これらから、NOD2がプロカスパーーゼ1の多量体化を促進することが明らかになった。

#### 実施例 4

[0083] (細胞内でのカスパーーゼ1依存的なproIL-1  $\beta$  からIL-1  $\beta$  への切断とIL-1  $\beta$  分泌

に及ぼすNOD2の効果)

proIL-1 $\beta$  安定発現細胞に、プロカスパーゼ1発現用プラスマドおよび／またはNOD2発現用プラスマドを導入し、NOD2存在下でプロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化が引き起こされ、細胞内でのproIL-1 $\beta$  からIL-1 $\beta$ への切断および細胞外へのIL-1 $\beta$  分泌量に変化が観察されるか否か検討を行った。

[0084] <材料およびその調製>

1. 各発現プラスマドの作成

プロカスパーゼ1 ORFをpCMV-Tag2に挿入し、N末にFLAG-tagが付加されたプロカスパーゼ1(FLAG-procaspase-1)発現用プラスマドを得た。また、NOD2-myc発現用プラスマドは、実施例3と同様の方法で作製した用いた。ProIL-1 $\beta$  ORFをpcDNA3.1/myc-Hisに挿入し、C末にmyc-Hisが付加されたproIL-1 $\beta$  発現用プラスマドを得た。

[0085] 2. proIL-1 $\beta$  安定発現細胞の作成

HEK293細胞に、proIL-1 $\beta$  発現用プラスマドをFuGene6(Roche社)を用いてトランسفエクションした。その後、1mg／mlのジェネティシン(geneticin)含有培地で増殖してくるクローンを選択した。選択したクローンのうち、proIL-1 $\beta$  の発現が認められたクローンを実験に用いた[ProIL-1 $\beta$  安定発現細胞(HEK293)]。

[0086] <方法>

1. 細胞内でのproIL-1 $\beta$  からIL-1 $\beta$ への切断に及ぼすNOD2の効果

6ウエルプレートに、IL-1 $\beta$  安定発現細胞(HEK293)を $5 \times 10^5$ ／well播種して一晩培養後、FLAG-procaspase-1発現用プラスマド $0.5 \mu\text{g}$ および／またはNOD2-myc発現用プラスマド $0.1\sim2.0 \mu\text{g}$ をFuGene6(Roche社)を用いてトランسفエクションした。DNAの総量は $2.5 \mu\text{g}$ となるようにpCMV-Tag2またはpCMV-Tag5にて調整した。24時間培養後、細胞に $0.25\text{ml}$ ／wellのリシスバッファー2を加え、細胞溶解液を作製した。

[0087] 各ウエルから調製した細胞溶解液 $40 \mu\text{l}$ に $5 \times$  SDSサンプルバッファー $10 \mu\text{l}$ を加え、 $100^\circ\text{C}$ で5分間熱処理した。その後、SDS-PAGEで展開し、抗myc抗体を用いてウエスタンプロッティングを行い、proIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$  それぞれの量およびNO

D2量を測定した。また、抗FLAG抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、プロカスパーーゼー1量を測定した。

[0088] 2. カスパーーゼー1依存的なIL-1 $\beta$  分泌に及ぼすNOD2の効果

6ウェルプレートに、IL-1 $\beta$  安定発現細胞(HEK293)を $5 \times 10^5$  /well播種して一晩培養後、FLAG-procaspase-1発現用プラスマド0. 5  $\mu$ gおよび/またはNOD2-myc発現用プラスマド0. 1~2. 0  $\mu$ gをFuGene6を用いてトランスフェクションした。DNAの総量は2. 5  $\mu$ gとなるようにpCMV-Tag2またはpCMV-Tag5にて調整した。24時間培養後、培養上清を回収した。回収した各ウェルの培養上清を10%牛胎児血清(FCS)含有DMEMで2倍希釈し、human IL-1 $\beta$  ELISA kit(Bio Source社)を用いて付属のプロトコールに従い、培養上清中のIL-1 $\beta$  量を測定した。

[0089] <結果>

図3に示すように、FLAG-procaspase-1発現プラスマドとNOD2-myc発現プラスマドとを共発現させた細胞において、NOD2-mycの発現量依存的に細胞内IL-1 $\beta$  量の増加が認められた。すなわち、細胞内でのカスパーーゼー1依存的なproIL-1 $\beta$  からIL-1 $\beta$ への切断が、NOD2により促進されることが判明した。

[0090] 図4に示すように、FLAG-procaspase-1発現プラスマドとNOD2-myc発現プラスマドとを共発現させた細胞において、NOD2-myc発現プラスマド量依存的に、細胞外へのIL-1 $\beta$  分泌量の増加が認められた。すなわち、カスパーーゼー1依存的なIL-1 $\beta$  の細胞外への分泌が、NOD2により促進されることが判明した。

産業上の利用可能性

[0091] 本発明は、炎症性疾患、例えば敗血症、炎症性腸疾患、クローン病およびリウマチ等の重篤なあるいは難治性の疾患の防止および/または治療のために利用可能であり、医薬分野において非常に有用性が高い。

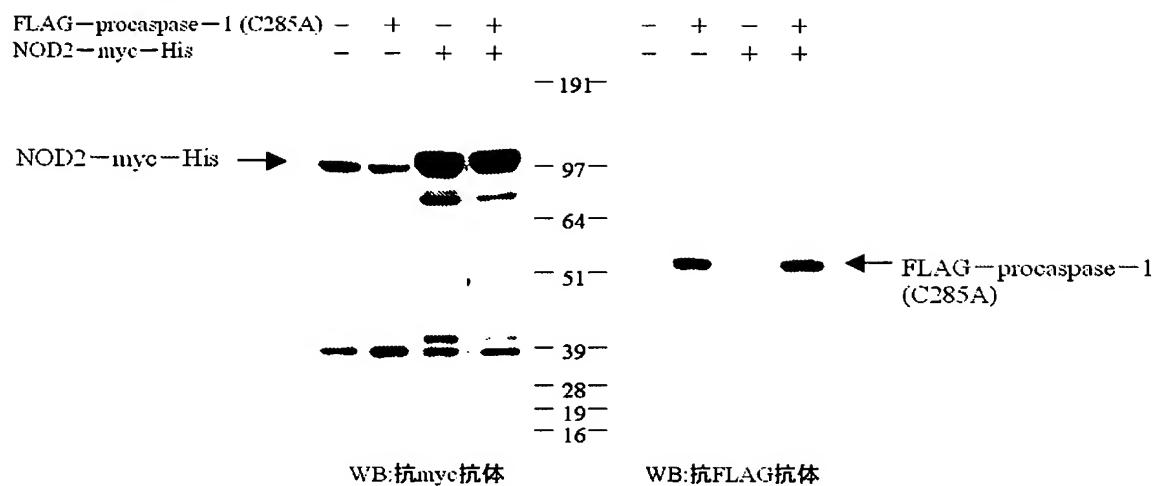
## 請求の範囲

- [1] 以下の群より選ばれる阻害方法:
  - (i) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の多量体化阻害方法、
  - (ii) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の活性化阻害方法、  
および
  - (iii) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするカスパーーゼ1(caspase-1)の生成阻害方法。
- [2] NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法。
- [3] NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ用いることを特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法。
- [4] 炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである請求項2または3に記載の防止方法および／または治療方法。
- [5] NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物の同定方法であって、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を可能にする条件下、NOD2および／またはプロカスパーーゼ1を化合物と接触させ、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出することにより、NOD2とプロカスパーーゼ1の結合を阻害するか否かを決定する方法。
- [6] 以下の群より選ばれる阻害剤:
  - (i) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の多量体化阻害剤、
  - (ii) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーーゼ1の活性化阻害剤、  
および
  - (iii) NOD2とプロカスパーーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とする

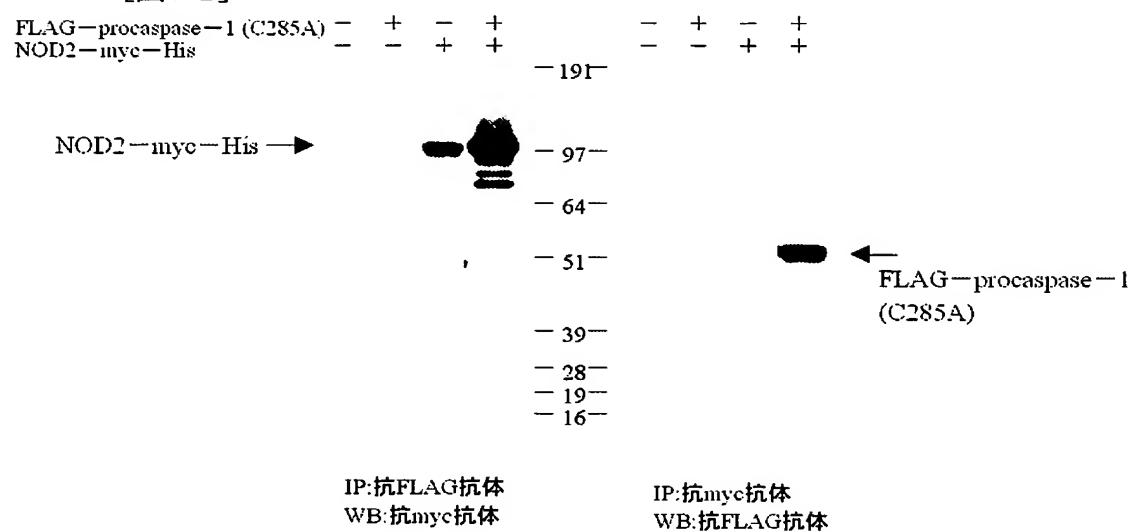
カスパーゼ1(caspase-1)の生成阻害剤。

- [7] 以下の群より選ばれる阻害剤;
  - (i) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、
  - (ii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、
- および
- (iii) NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するカスパーゼ1(caspase-1)の生成阻害剤。
- [8] NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。
- [9] NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。
- [10] 請求項6または7に記載の阻害剤を含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。
- [11] 炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである請求項8から10のいずれか1項に記載の防止剤および／または治療剤。
- [12] NOD2とプロカスパーゼ1(procaspase-1)の結合阻害によるプロカスパーゼ1の多量体化阻害を特徴とする、炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。
- [13] 炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである請求項12に記載の防止剤および／または治療剤。
- [14] 請求項5に記載の同定方法に用いることを特徴とする試薬キットであって、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、プロカスパーゼ1(procaspase-1)、プロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット。

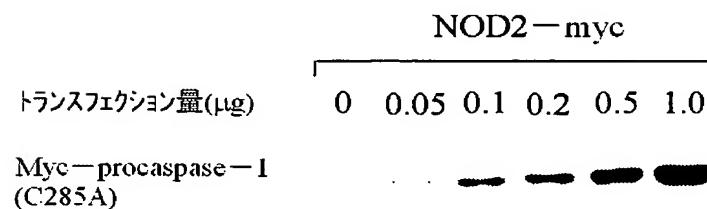
[図1-A]



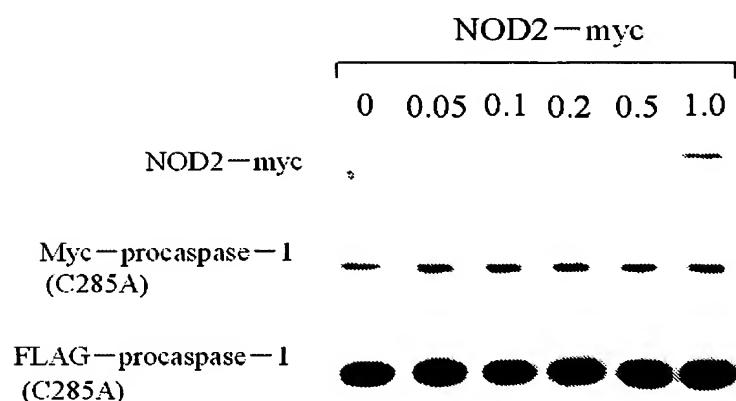
[図1-B]



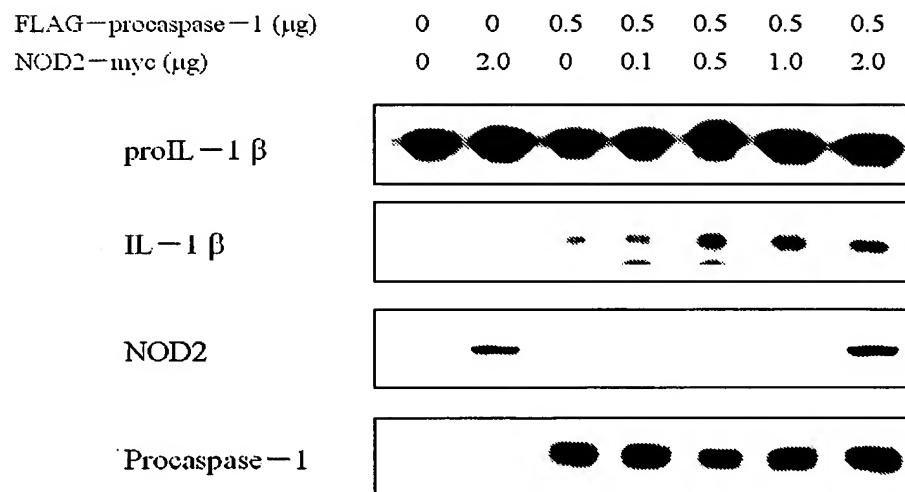
[図2-A]



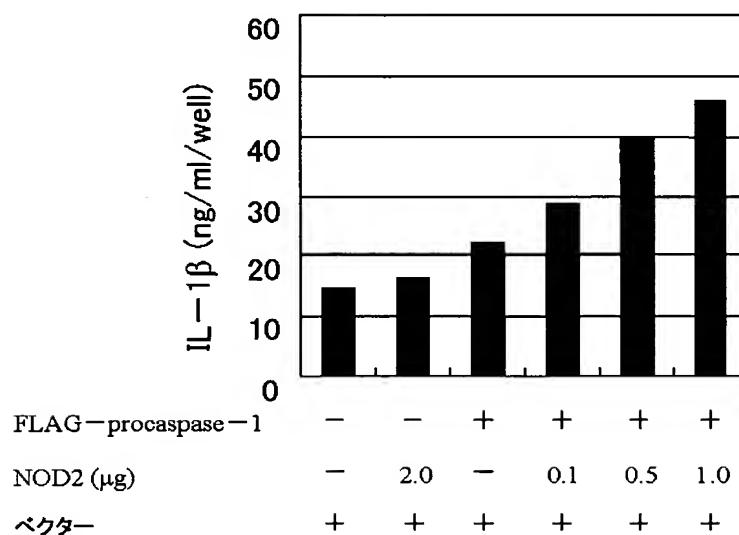
[図2-B]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017586

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

 Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P1/00, 1/04, 29/00, 31/04//C12N15/57, 15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P1/00, 1/04, 29/00, 31/04//C12N15/57, 15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	DAMIANO, Jason S. et al., Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses, Biochem Journal, 2004 Jul., Vol.381, pages 213 to 219, full text; particularly, Fig. 7B	5-14
Y	YOO, Nam Jin et al., Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 $\beta$ processing through the interaction with pro-caspase-1, Biochem.Biophys.Res.Commun., 2002, Vol.299, pages 652 to 658, full text; particularly, page 652; abstract	5-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 24 January, 2005 (24.01.05)

 Date of mailing of the international search report  
 08 February, 2005 (08.02.05)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017586

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OGURA, Yasunori et al., Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B, Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, pages 4812 to 4818, full text; particularly, page 4812; abstract	5-14
Y	LEE, Sug Hyng et al., COP a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing, Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276, pages 34495 to 34500	5-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017586

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1 – 4  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1 to 4 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' A61K45/00, A61P1/00, 1/04, 29/00, 31/04, //C12N15/57, 15/12

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' A61K45/00, A61P1/00, 1/04, 29/00, 31/04, //C12N15/57, 15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN) EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P A	DAMIANO, Jason S. <i>et al</i> , Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses, Biochem Journal, 2004 Jul., Vol. 381, pp213-219, 全文, 特にFig. 7B	5-14
Y	YOO, Nam Jin <i>et al</i> , Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 $\beta$ processing through the interaction with pro-caspase-1, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, Vol. 299, pp652-658, 全文, 特に第652頁Abstract	5-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 01. 2005

国際調査報告の発送日

08. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	OGURA, Yasunori <i>et al</i> , Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B, Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, pp4812-4818, 全文, 特に第4812頁Abstract	5-14
Y	LEE, Sug Hyng <i>et al</i> , COP a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing, Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, pp34495-34500	5-14

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 1-4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲1-4は治療による人体の処置方法に関するものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**